



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12M</b>	<b>A2</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/64559</b> (43) Date de publication internationale: 16 décembre 1999 (16.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/CH99/00243 (22) Date de dépôt international: 4 juin 1999 (04.06.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/07596                      8 juin 1998 (08.06.98)                      FR (71)(72) Déposant et inventeur: HÄNNI, Claude [CH/CH]; 80, rue de la Charrière, CH-2300 La Chaux-de-Fonds (CH). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): STOPPINI, Luc [FR/CH]; 26, rue Carteret, CH-1202 Genève (CH). (74) Mandataire: NITHARDT, Roland; Cabinet Roland Nithardt, Conseils en Propriété Industrielle S.A., Y-Parc / 9, rue Galilée, CH-1400 Yverdon-les-Bains (CH).	(81) Etats désignés: AU, CA, IL, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	

(54) Title: DEVICE FOR ORGANIC CELL CULTURE AND FOR STUDYING THEIR ELECTROPHYSIOLOGICAL ACTIVITY AND MEMBRANE USED IN SAID DEVICE

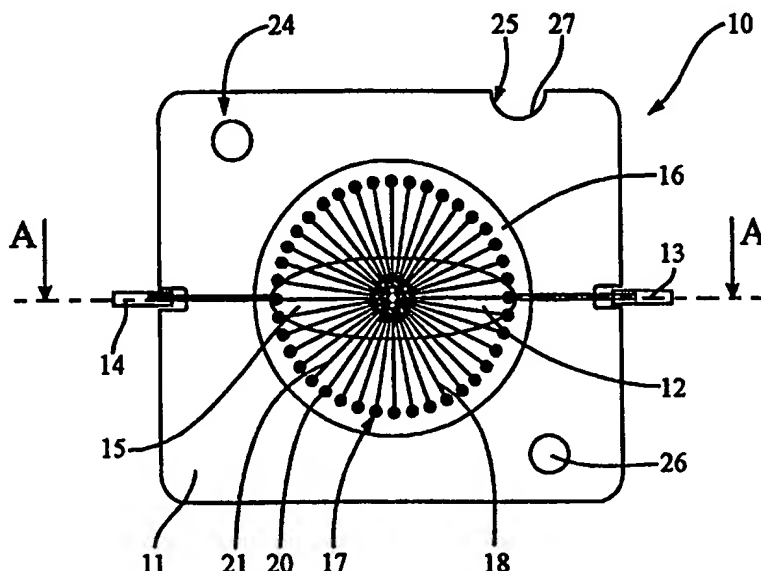
(54) Titre: DISPOSITIF DE CULTURE DE CELLULES ORGANIQUES ET D'ETUDE DE LEUR ACTIVITE ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET MEMBRANE UTILISEE DANS UN TEL DISPOSITIF

## (57) Abstract

The invention concerns a device comprising a support (11) in the thickness of which is produced a supply chamber (12) with an inlet duct (13) for nutrient liquid and a discharge duct (14) for said liquid. A capsule (22) capable of receiving organic cells is provided on the support (11). The supply chamber (12) and the support (11) are separated by a porous membrane (16) comprising an array of electrodes (17) arranged so as to be in contact with different zones of the group of cells, thereby enabling their electrophysiological activity to be analysed. Said device enables to increase the life span of cells and to carry out analyses simply and without affecting the cell organisation.

## (57) Abrégé

Le dispositif comporte un support (11) dans l'épaisseur duquel est réalisée une chambre d'alimentation (12) ayant un conduit d'entrée (13) de liquide nutritif et un conduit d'évacuation (14) de ce liquide. Une capsule (22) pouvant recevoir des cellules organiques est disposée sur le support (11). La chambre d'alimentation (12) et le support (11) sont séparés par une membrane poreuse (16) comportant un réseau d'électrodes (17) disposées de façon à pouvoir être en contact avec différentes zones de l'amas de cellules et permettre ainsi d'analyser leur activité électrophysiologique. Ce dispositif permet d'augmenter la durée de vie des cellules et d'effectuer des analyses de façon simple, efficace et sans nuire à l'organisation des cellules.



# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaidjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**DISPOSITIF DE CULTURE DE CELLULES ORGANIQUES ET D'ETUDE DE  
LEUR ACTIVITE ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET MEMBRANE UTILISEE  
DANS UN TEL DISPOSITIF**

5 La présente invention concerne un dispositif pour la culture d'amas de  
cellules organiques et pour l'étude de l'activité électrophysiologique des  
cellules, dans lequel les cellules sont placées sur au moins une membrane  
poreuse dont la face inférieure est en contact avec un liquide nutritif, ce  
dispositif comportant au moins une électrode agencée pour être en contact  
10 avec ledit amas de cellules organiques.

La présente invention concerne également une membrane réalisée en une  
matière synthétique poreuse, ainsi que l'utilisation de cette membrane pour  
réaliser un modèle de barrière hémato-encéphalique.

15 Il existe actuellement différents dispositifs permettant de mesurer l'activité  
électrophysiologique d'amas de cellules organiques.

Un tel dispositif est en particulier décrit dans la demande de brevet français  
20 FR-A-2 733 055. Dans ce document, il est décrit un dispositif qui permet de  
maintenir en vie des explants tissulaire et de recueillir et d'analyser en continu  
l'activité électrophysiologique et biochimique du tissu étudié. Ce dispositif est  
formé de deux demi-cartes formant respectivement la partie supérieure et la  
partie inférieure de l'interface qui s'assemblent pour former une carte destinée  
25 à être insérée dans un boîtier électronique spécialement conçu à cet effet.

Ce dispositif donne des résultats satisfaisants, mais présente toutefois un  
certain nombre d'inconvénients. En effet, les électrodes sont forcées en  
direction des cellules jusqu'à ce qu'elles soient en contact avec celles-ci. Ceci  
blesse un certain nombre de cellules, ce qui diminue leur durée de survie.  
30 Après un certain temps, les électrodes et les cellules sont intimement liées.  
Lorsqu'il est nécessaire de retirer les cellules, par exemple, pour réaliser un

analyse au moyen d'un microscope, une partie d'entre elles restent fixées aux électrodes, ce qui a pour effet de détruire la structure de l'amas de cellules et de les rendre ainsi inutilisables.

5 Dans ce dispositif, les cellules sont nourries par dessous et les électrodes sont posées sur l'amas de cellules. Ces électrodes empêchent donc une visualisation des tissus. Cette visualisation est importante notamment parce qu'elle permet de connaître l'organisation des tissus et de déterminer ainsi les électrodes qui doivent être utilisées. Elle permet également de contrôler la  
10 survie de ces tissus.

En outre, le fait de placer les électrodes sur les cellules empêche d'intervenir sur les tissus analysés. De plus, ceci implique que les électrodes doivent avoir une résistance mécanique relativement élevée puisqu'elles sont formées de  
15 pistes de cuivre ne reposant pas sur un substrat. En outre, la conception de la carte en deux demi-cartes implique la fabrication et l'assemblage d'un nombre élevé de pièces.

Comme les électrodes sont disposées entre les deux demi-cartes, il faut  
20 qu'une de leur extrémité soit amenée dans une zone accessible par un connecteur électrique. Comme chaque carte est à usage unique, le coût d'utilisation dû au nombre de pièces et à la complexité du dispositif est élevé.

D'autres dispositifs comportant un substrat en verre ont également été  
25 développés. Dans ces dispositifs, les tissus biologiques doivent être collés pour qu'ils puissent adhérer au substrat. Le substrat n'étant pas poreux, il est nécessaire de placer le dispositif dans un appareillage qui assure un mouvement qui permet au tissu d'être successivement immergé et émergé pour que le tissu puisse respirer. Ce dispositif est lourd et ne permet pas une  
30 survie à long terme lorsque l'on arrête le mouvement. En outre, il est difficile de réaliser plusieurs substrats simultanément sur une plaque. La fabrication de tels substrats est particulièrement longue et coûteuse.

La présente invention permet de pallier ces inconvénients en réalisant un dispositif bon marché, comportant un nombre restreint de pièces et permettant d'effectuer une analyse électrophysiologique et/ou microscopique des cellules sans les détruire.

Ces buts sont atteints par un dispositif tel que décrit en préambule et caractérisé en ce que les électrodes sont réalisées sur la membrane poreuse.

10 Selon un mode de réalisation préféré, le dispositif comporte un réseau d'électrodes.

Chaque électrode comporte avantageusement une zone d'analyse agencée pour pouvoir être disposée en contact avec l'amas de cellules, et une zone de mesure agencée pour pouvoir être mise en contact avec un appareil générant un signal électrique et/ou mesurant un signal électrique.

La membrane poreuse est de préférence maintenue sur un support rigide.

20 Ce support rigide contient avantageusement une chambre d'alimentation en liquide nutritif, cette chambre communiquant avec un conduit d'entrée et un conduit d'évacuation de liquide nutritif et étant pourvue d'une ouverture communiquant avec ladite membrane poreuse.

25 Selon une forme de réalisation préférée, la membrane poreuse est surmontée d'une capsule agencée pour maintenir les cellules organiques dans un environnement contrôlé. Cette capsule peut comporter un conduit d'injection de gaz et un conduit d'évacuation de gaz.

30 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les zones de mesure des électrodes du réseau d'électrodes sont disposées sur un cercle.

Le réseau d'électrodes comporte avantageusement un moyen d'indexage de sa position.

5 Selon une forme de réalisation préférée, la membrane poreuse est transparente.

10 Les buts fixés par l'invention sont également atteints par une membrane telle que définie en préambule et caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une électrode déposée sur cette membrane.

Selon une forme de réalisation préférée, la membrane comporte un réseau d'électrodes déposées sur cette membrane.

15 Selon une forme de réalisation préférée, chaque électrode comporte au moins une zone d'analyse, une zone de mesure et une zone de connexion.

20 Finalement, les buts de l'invention sont également atteints par un procédé pour réaliser un modèle de barrière hémato-encéphalique à partir d'une membrane telle que définie ci-dessus, ce procédé étant caractérisé en ce qu'il comporte des étapes consistant à traiter la membrane poreuse de façon à permettre à des cellules endothéliales d'y adhérer, à placer des cellules endothéliales sur une face ne comportant pas d'électrode, de la membrane poreuse, à cultiver lesdites cellules endothéliales jusqu'à ce qu'elles forment une couche, et à placer une culture organotypique en tranche sur l'autre face  
25 comportant au moins une électrode, de la membrane poreuse.

La présente invention sera mieux comprise en référence à la description d'un mode de réalisation particulier de l'invention et aux dessins annexés dans lesquels :

30

- la figure 1 est une vue de dessus du dispositif selon la présente invention;

- la figure 2 est une vue agrandie d'une partie du dispositif de la figure 1;
- la figure 3 est une vue en coupe selon la ligne A-A de la figure 1; et
- 5 - la figure 4 est une vue en coupe illustrant une utilisation particulière du dispositif de l'invention.

En référence aux figures, le dispositif 10 comporte un support 11 dans l'épaisseur duquel est réalisée une chambre d'alimentation 12 en liquide nutritif. Cette chambre d'alimentation communique avec un conduit d'entrée 13 lié à un système de perfusion (non représenté) de liquide nutritif. Cette chambre communique également avec un conduit d'évacuation 14 dudit liquide nutritif.

15 Cette chambre comporte également une ouverture 15 dans le haut du support. Une membrane poreuse 16 transparente est placée sur le support 11 de façon à recouvrir l'ouverture 15. Cette membrane poreuse 16 peut être réalisée par exemple en polyéthylène téréphtalate (PET) ou en polycarbonate notamment. Elle comporte un réseau d'électrodes 17 réalisées directement sur la membrane. Chaque électrode 18 du réseau d'électrodes 17 comporte 20 une zone d'analyse 19, une zone de mesure 20 et une zone de connexion 21.

La zone d'analyse 19 est une partie non isolée de l'électrode. Cette zone se trouve au-dessus de l'ouverture 15 de la chambre d'alimentation 12. La zone 25 de mesure 20 est également une partie non isolée de l'électrode. Elle est réalisée, par exemple, sous la forme d'un cercle ayant une surface suffisante pour être facilement mise en contact avec un connecteur.

La zone de connexion 21 est une partie isolée de l'électrode, reliant la zone 30 d'analyse 19 à la zone de mesure 20.

Les électrodes peuvent être réalisées, par exemple, en or ou en platine. Le réseau d'électrodes peut être réalisé selon plusieurs procédés distincts. Dans l'un des procédés, on évapore une couche d'or par exemple, sur la membrane poreuse au moyen d'un procédé connu sous la dénomination de "Plasma vapor deposition" (PVD) ou par évaporation sous vide. On dépose ensuite une couche de matière photorésistante. Cette couche est soumise à une insolation à travers un premier masque photographique reproduisant le réseau d'électrodes. L'ensemble est ensuite révélé. L'or est usiné chimiquement, puis la membrane est rincée avant que la première couche de matière photorésistante ne soit totalement dissolue.

L'isolation de certaines parties du réseau d'électrodes est effectuée de la façon suivante: une couche d'une deuxième matière photorésistante est déposée par trempage sur la membrane. Cette matière subit une cuisson, puis une nouvelle insolation est effectuée à travers un masque photographique reproduisant les zones isolées des électrodes. La membrane subit ensuite un développement, puis un rinçage.

Le réseau d'électrodes peut également être réalisé par évaporation d'or par procédé PVD à travers un premier masque. Le "réseau" d'isolant est ensuite déposé de façon similaire par un procédé PVD à travers un deuxième masque. L'isolation peut par exemple être de l'oxyde de titane.

Chaque électrode peut également comporter une zone non isolée, constituant la zone d'analyse 19, ayant une forme carrée par exemple. Cette zone non isolée est disposée à proximité de l'extrémité de chaque électrode, au-dessus de l'ouverture 15 de la chambre d'alimentation. De l'or ou du platine est ensuite déposé par électrodéposition dans la zone non isolée. Ce procédé est avantageux à différents points de vue. Il permet d'une part d'avoir un bon contact électrique entre les cellules et les électrodes. D'autre part, cela diminue l'impédance des électrodes. Finalement, il est particulièrement facile de modifier la surface active des électrodes, c'est-à-dire la surface de la zone



non isolée. Il est également possible de réaliser des électrodes ayant des surfaces actives différentes dans un même réseau d'électrodes.

5 Dans le mode de réalisation illustré, les zones de mesure des électrodes sont disposées sur un cercle de telle façon qu'elles soient facilement accessibles pour activer les électrodes ou pour mesurer des signaux électriques. Il est clair que d'autres configurations pourraient également être choisies.

10 Le dispositif 10 comporte en outre une capsule 22 formée d'une paroi latérale et d'un fond partiellement ouvert. Cette capsule est fixée rigidement au-dessus de la membrane poreuse de telle façon que l'ouverture 15 de la chambre d'alimentation communique avec l'ouverture du fond de la capsule 22 par l'intermédiaire de la membrane poreuse 16.

15 Cette capsule 22 comporte en outre un couvercle 23 qui peut être placé sur la capsule de façon à protéger son contenu du milieu extérieur. Ce couvercle peut être fermé hermétiquement. La capsule peut également comporter un conduit 28 d'injection de gaz et un conduit 29 d'évacuation de gaz. En fonction des mesures à effectuer ou de la nature des cellules ou des produits  
20 à tester, un gaz peut être introduit dans ce conduit d'injection de gaz. Il est également possible de générer un flux de gaz dans la chambre en introduisant un gaz dans le conduit d'injection et en l'évacuant par le conduit d'évacuation de gaz.

25 Le support 11 est rigide et comporte des moyens de maintien 24 et des moyens d'indexage 25 de sa position. Les moyens de maintien 24 peuvent être réalisés sous la forme de deux trous 26 coopérant avec deux tiges d'un boîtier de connexion (non représenté). Ces moyens de maintien permettent d'assurer le maintien en position du dispositif 10 dans ce boîtier de  
30 connexion.

Les moyens d'indexage 25 sont, par exemple, formés par une encoche 27 coopérant avec un bossage (non représenté) du boîtier de connexion. Ils permettent d'assurer le positionnement correct du dispositif dans le boîtier de connexion et évitent en particulier que ce dispositif ne soit placé dans une position symétrique par rapport à la position correcte.

Lors de l'utilisation du dispositif tel qu'illustré par les figures 1 à 3, un amas cellulaire est placé dans la capsule 22. Cet amas peut être placé directement sur la membrane poreuse 16, de façon conventionnelle. Il est toutefois également possible de cultiver des cellules sur une membrane poreuse ayant par exemple une forme circulaire, puis de placer ces cellules avec la membrane circulaire dans la capsule. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas où des cellules doivent être cultivées avant de pouvoir procéder à leur analyse. Il est ainsi possible de stimuler et d'enregistrer les réponses électrophysiologiques des cellules à travers la membrane prédécoupée, sans que ce tissu biologique soit en contact direct avec les électrodes.

Un liquide nutritif est amené dans la chambre d'alimentation 12 par le conduit d'entrée 13. Ce liquide entre en contact avec la membrane poreuse et recouvre totalement l'amas cellulaire de liquide nutritif par un film de milieu de culture. Ceci permet une bonne diffusion des gaz dans toute l'épaisseur du tissu, et assure une durée de vie importante des cellules. D'autre part, cela permet d'éviter la nécessité de mettre l'ensemble du dispositif en mouvement, comme dans certains dispositifs de l'art antérieur. Le couvercle 23 de la capsule 22 est généralement maintenu fermé afin d'éviter des pollutions dues au milieu extérieur.

Le film de liquide nutritif a également pour effet de plaquer l'amas cellulaire contre les électrodes, ce qui assure un bon contact électrique entre les électrodes et les cellules, sans qu'il soit nécessaire de coller ces cellules.

Le dispositif est avantageusement placé dans un boîtier de connexion (non représenté) qui relie chacune des zones de mesure des électrodes à une entrée du boîtier de connexion. Ceci permet de transmettre de façon simple, un signal électrique à une ou plusieurs électrodes sélectionnées du réseau d'électrodes, en introduisant ce signal à l'entrée ou aux entrées correspondantes du boîtier de connexion.

De même, ceci permet de mesurer de façon simple, un signal électrique d'une ou plusieurs électrodes du réseau d'électrodes.

Les conduits d'entrée 13 et d'évacuation 14 permettent d'introduire des substances chimiques à tester, tout en maintenant le dispositif dans son environnement dans lequel les mesures électriques sont effectuées.

La membrane poreuse étant transparente, l'amas cellulaire peut être analysé au microscope sans qu'il soit nécessaire de le retirer des électrodes et, par conséquent, sans détruire sa structure. La membrane peut également être retirée du support, ce qui facilite sa manipulation lors de différents tests.

La figure 4 illustre une utilisation particulière du dispositif 30 selon l'invention, dans lequel un modèle de barrière hémato-encéphalique a été réalisé. Cette barrière hémato-encéphalique est formée de cellules endothéliales qui tapissent les capillaires du système nerveux central. Ces cellules ont des propriétés spécifiques par rapport à celles des autres organes. Elles forment une barrière qui empêche le passage de la plupart des molécules hydrosolubles, sauf de celles qui ont un transporteur particulier tel que par exemple le glucose.

Cette barrière joue un rôle important dans la protection des tissus nerveux. Elle empêche parfois le passage de certains médicaments actifs, mais qui ne peuvent pas traverser cette barrière. Pour cette raison, il est important de

disposer de modèles de barrières hémato-encéphaliques, pour tester la perméabilité de nouveaux médicaments.

5 Le modèle de barrière hémato-encéphalique développé avec le dispositif de la présente invention est obtenu par la co-culture de cellules endothéliales 31 et de cultures organotypiques 32 en tranche. Ce modèle de barrière est particulièrement intéressant du fait qu'il permet de connaître en une seule expérience, la perméabilité des molécules et ses effets sur les tissus nerveux.

10 Comme cela est illustré en détail par la figure 4, la co-culture des cellules endothéliales 31 et de cultures organotypiques 32 est intégrée à la membrane poreuse 16. L'ensemble ainsi formé permet de tester la perméabilité de molécules dans un modèle qui est très proche de la situation in-vivo, mais qui est nettement plus simple et moins coûteux à réaliser.

15 Dans ce mode de réalisation, la membrane poreuse 16 est tout d'abord traitée de façon à permettre aux cellules endothéliales 31 d'y adhérer. Des cellules endothéliales sont ensuite injectées dans la chambre. Lorsqu'elles forment une couche compacte, une culture organotypique 32 est placée de l'autre  
20 côté de la membrane, sur les électrodes 18 formant le réseau d'électrodes. L'ensemble du dispositif est conservé pendant quelques jours dans un incubateur, pendant la durée nécessaire à la formation de la barrière hémato-encéphalique. Le dispositif de l'invention, auquel est ajouté la barrière hémato-encéphalique est utilisé comme décrit précédemment. Les molécules  
25 à tester sont injectées dans la chambre par le conduit d'entrée 13.

La perméabilité des molécules neuroactives peut être directement déterminée en analysant les modifications de l'activité électrophysiologique du tissu nerveux, ces modification pouvant apparaître du fait de la présence des  
30 molécules à tester dans le tissu. Le réseau d'électrodes permet de stimuler et d'enregistrer simultanément l'activité électrique du tissu nerveux par l'intermédiaire d'un dispositif de traitement adéquat.

5 Le dispositif selon la présente invention est généralement prévu pour un usage unique. Il est jeté après chaque analyse. Le nombre de pièces qui le compose a été réduit à un minimum. Ceci permet donc de réduire le coût du dispositif.

10 D'autre part, grâce à l'utilisation d'un substrat souple, il est facile de réaliser plusieurs substrats simultanément, sur une plaque, puis de découper la plaque lorsque les électrodes ont été réalisées. Ceci permet une fabrication industrielle des substrats.

15 La présente invention n'est pas limitée au mode de réalisation décrit, mais s'étend à toute variante évidente pour un homme du métier. En particulier, la forme de la membrane poreuse 16 pourrait être non circulaire. En utilisant, par exemple, une membrane poreuse carrée, le positionnement des côtés du carré permettrait d'assurer le positionnement des électrodes. Ce positionnement peut être important lorsque le dispositif doit coopérer avec un boîtier de connexion dans lequel la position des connecteurs est fixe.

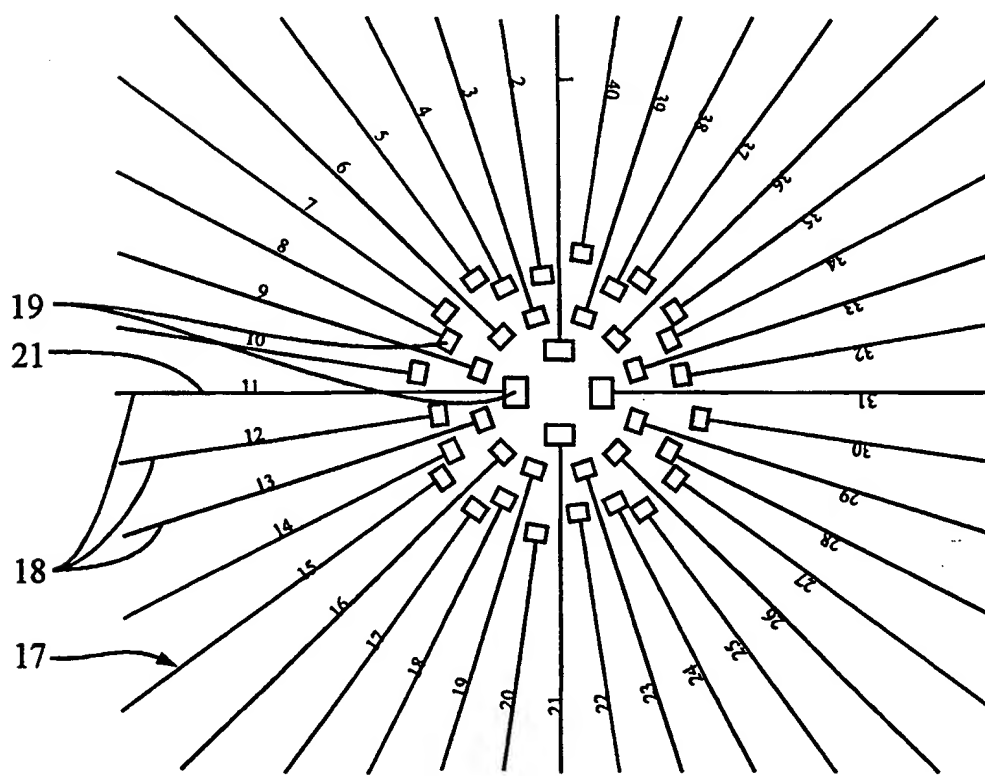
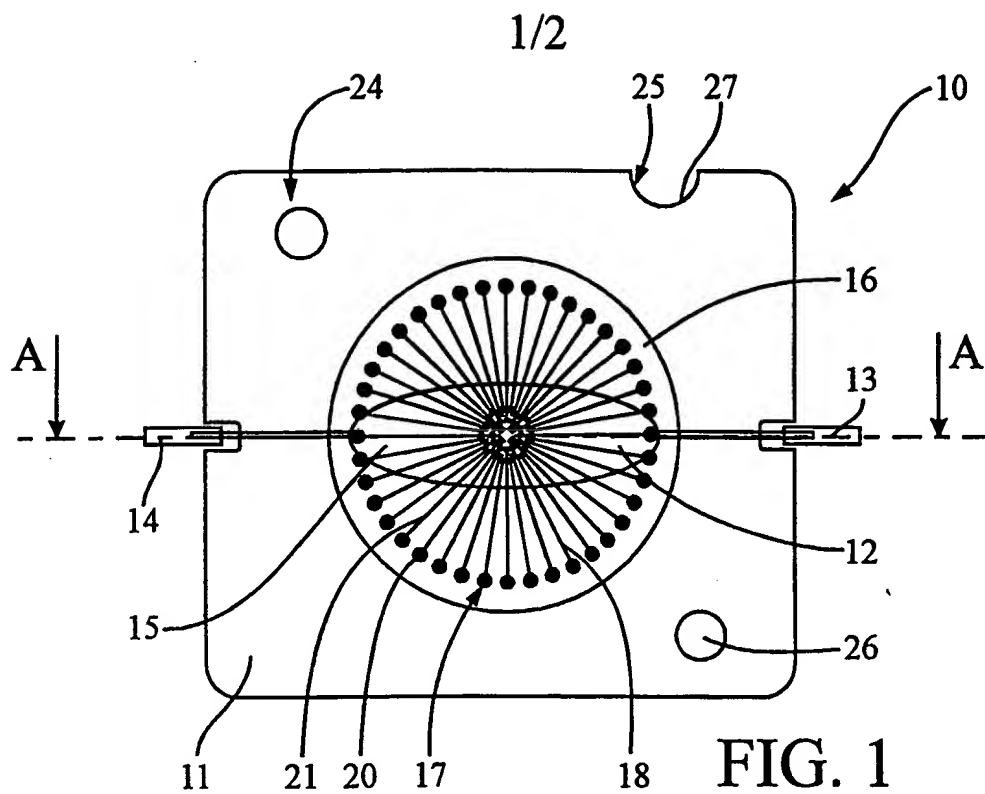
**REVENDICATIONS**

1. Dispositif pour la culture d'amas de cellules organiques et pour l'étude de l'activité électrophysiologique des cellules, dans lequel les cellules sont placées sur au moins une membrane poreuse dont la face inférieure est en contact avec un liquide nutritif, ce dispositif comportant au moins une électrode agencée pour être en contact avec ledit amas de cellules organiques, caractérisé en ce que les électrodes (18) sont réalisées sur la membrane poreuse (16).
2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte un réseau d'électrodes (17).
3. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que chaque électrode (18) comporte une zone d'analyse (19) agencée pour pouvoir être disposée en contact avec l'amas de cellules, et une zone de mesure (20) agencée pour pouvoir être mise en contact avec un appareil générant un signal électrique et/ou mesurant un signal électrique.
4. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la membrane poreuse (16) est maintenue sur un support rigide (11).
5. Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que le support rigide (11) contient une chambre d'alimentation (12) en liquide nutritif, cette chambre communiquant avec un conduit d'entrée (13) et un conduit d'évacuation (14) de liquide nutritif et étant pourvue d'une ouverture (15) communiquant avec ladite membrane poreuse (16).
6. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la membrane poreuse (16) est surmontée d'une capsule (22) agencée pour maintenir les cellules organiques dans un environnement contrôlé.

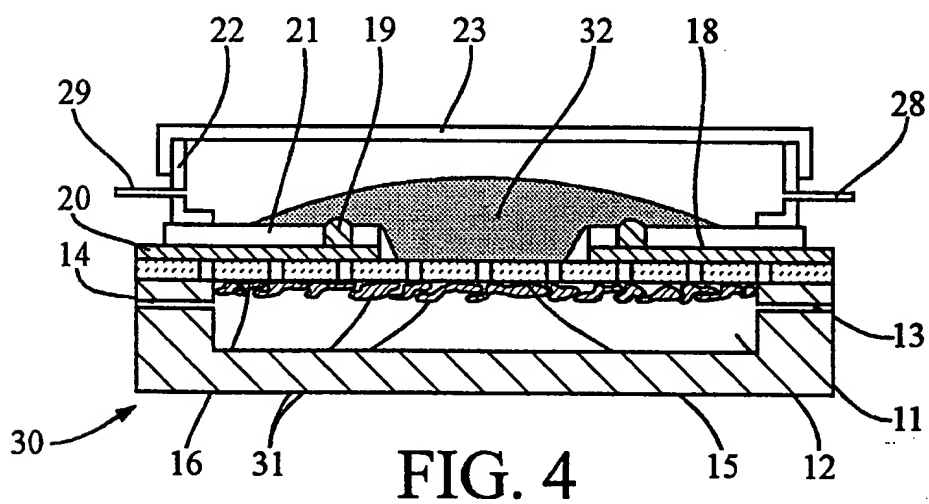
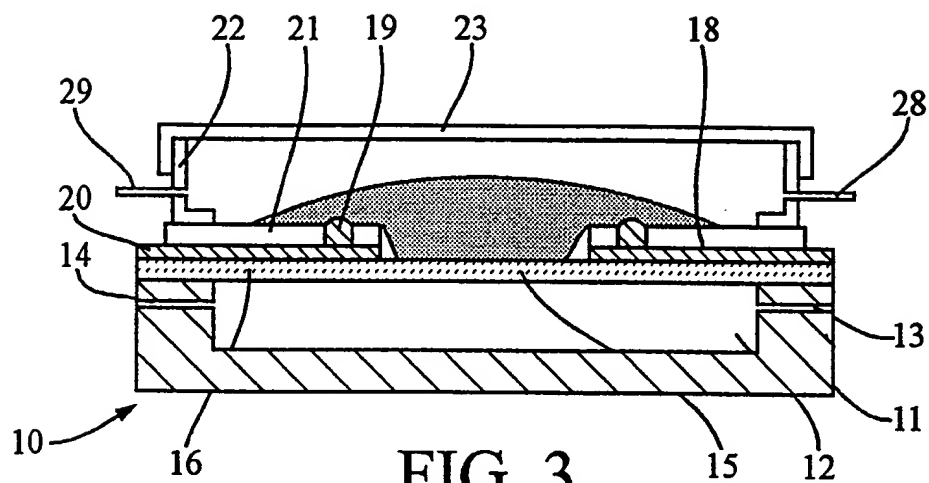
7. Dispositif selon la revendication 6, caractérisé en ce que la capsule (22) comporte un conduit (28) d'injection de gaz et un conduit (29) d'évacuation de gaz.
- 5 8. Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que les zones de mesure (20) des électrodes (18) du réseau d'électrodes (17) sont disposées sur un cercle.
- 10 9. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réseau d'électrodes (17) comporte un moyen d'indexage (25) de sa position.
10. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la membrane poreuse (16) est transparente.
- 15 11. Membrane réalisée en une matière synthétique poreuse, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une électrode (18) déposée sur cette membrane.
- 20 12. Membrane selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comporte un réseau d'électrodes (17) déposées sur cette membrane.
- 25 13. Membrane selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que chaque électrode (18) comporte au moins une zone d'analyse (19), une zone de mesure (20) et une zone de connexion (21).
14. Utilisation d'une membrane selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, pour réaliser un modèle de barrière hémato-encéphalique.
- 30 15. Procédé pour réaliser un modèle de barrière hémato-encéphalique à partir d'une membrane selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte des étapes consistant à :

- traiter la membrane poreuse (18) de façon à permettre à des cellules endothéliales (31) d'y adhérer,
- placer des cellules endothéliales (31) sur une face ne comportant pas d'électrode, de la membrane poreuse (18),
- 5 – cultiver lesdites cellules endothéliales (31) jusqu'à ce qu'elles forment une couche, et
- placer une culture organotypique en tranche (32) sur l'autre face, comportant au moins une électrode, de la membrane poreuse (18).





2/2



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 décembre 1999 (16.12.1999)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 99/64559 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>6</sup>:

G01N 33/487, C12M 1/34

(71) Déposant et

(72) Inventeur: HÄNNI, Claude [CH/CH]; 80, rue de la Charrière, CH-2300 La Chaux-de-Fonds (CH).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/CH99/00243

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): STOPPINI, Luc [FR/CH]; 26, rue Carteret, CH-1202 Genève (CH).

(22) Date de dépôt international: 4 juin 1999 (04.06.1999)

(25) Langue de dépôt:

français

(74) Mandataire: NITHARDT, Roland; Cabinet Roland Nithardt, Conseils en Propriété Industrielle S.A., Y-Parc / 9, rue Galilée, CH-1400 Yverdon-les-Bains (CH).

(26) Langue de publication:

français

(81) États désignés (national): AU, CA, IL, JP, NZ, US.

(30) Données relatives à la priorité:

98/07596

8 juin 1998 (08.06.1998)

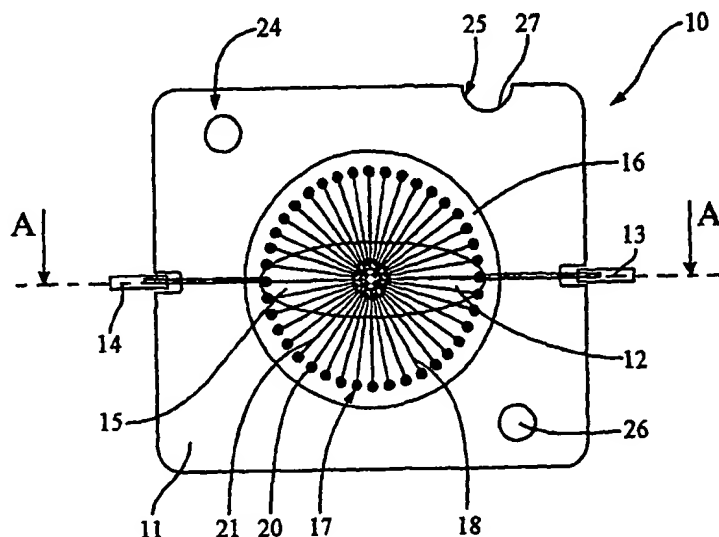
FR

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DEVICE FOR ORGANIC CELL CULTURE AND FOR STUDYING THEIR ELECTROPHYSIOLOGICAL ACTIVITY AND MEMBRANE USED IN SAID DEVICE

(54) Titre: DISPOSITIF DE CULTURE DE CELLULES ORGANIQUES ET D'ETUDE DE LEUR ACTIVITE ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET MEMBRANE UTILISEE DANS UN TEL DISPOSITIF



(57) Abstract: The invention concerns a device comprising a support (11) in the thickness of which is produced a supply chamber (12) with an inlet duct (13) for nutrient liquid and a discharge duct (14) for said liquid. A capsule (22) capable of receiving organic cells is provided on the support (11). The supply chamber (12) and the support (11) are separated by a porous membrane (16) comprising an array of electrodes (17) arranged so as to be in contact with different zones of the group of cells, thereby enabling their electrophysiological activity to be analysed. Said device enables to increase the life span of cells and to carry out analyses simply and without affecting the cell organisation.

[Suite sur la page suivante]

WO 99/64559 A3

**Publiée:**

— Avec rapport de recherche internationale.

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:**

12 juillet 2001

---

(57) **Abrégé:** Le dispositif comporte un support (11) dans l'épaisseur duquel est réalisée une chambre d'alimentation (12) ayant un conduit d'entrée (13) de liquide nutritif et un conduit d'évacuation (14) de ce liquide. Une capsule (22) pouvant recevoir des cellules organiques est disposée sur le support (11). La chambre d'alimentation (12) et le support (11) sont séparés par une membrane poreuse (16) comportant un réseau d'électrodes (17) disposées de façon à pouvoir être en contact avec différentes zones de l'amas de cellules et permettre ainsi d'analyser leur activité électrophysiologique. Ce dispositif permet d'augmenter la durée de vie des cellules et d'effectuer des analyses de façon simple, efficace et sans nuire à l'organisation des cellules.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CH 99/00243

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6. G01N 33/487, C12M 1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6. G01N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 759 846 A (STOPPINI LUC ET AL) 2 June 1998 (02.06.98), cited in the application	1
A	EP 0 689 051 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 27 December 1995 (27.12.95)	
A	DATABASE WPI, Section CH, Week 8523 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 85-139721 XP002095669 & SU 1 124 022 A (AS USSR BIOEQUIP DE), 15 November 1984 (15.11.84) abstract  -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 1999 (18.10.99)

Date of mailing of the international search report

25 October 1999 (25.10.99)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PC1/CH 99/00243

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5759846 A	02-06-1998	FR 2733055 A	18-10-1996
		AU 5117396 A	30-10-1996
		CA 2191974 A	17-10-1996
		EP 0765384 A	02-04-1997
		WO 9632467 A	17-10-1996
		JP 10501703 T	17-02-1998
		NO 965307 A	11-12-1996
EP 0689051 A	27-12-1995	CN 1131744 A	25-09-1996
		JP 8062209 A	08-03-1996
		KR 150390 B	01-10-1998
		US 5563067 A	08-10-1996
SU 1124022 A	15-11-1984		

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PC 1 / CH 99/00243

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 G01N33/487 C12M1/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N C12M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 759 846 A (STOPPINI LUC ET AL) 2 juin 1998 (1998-06-02) cité dans la demande ---	
A	EP 0 689 051 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 27 décembre 1995 (1995-12-27) ---	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8523 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 85-139721 XP002095669 & SU 1 124 022 A (AS USSR BIOEQUIP DE), 15 novembre 1984 (1984-11-15) abrégé -----	1



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/10/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Coucke, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCI/CH 99/00243

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5759846 A	02-06-1998	FR 2733055 A	18-10-1996
		AU 5117396 A	30-10-1996
		CA 2191974 A	17-10-1996
		EP 0765384 A	02-04-1997
		WO 9632467 A	17-10-1996
		JP 10501703 T	17-02-1998
		NO 965307 A	11-12-1996
EP 0689051 A	27-12-1995	CN 1131744 A	25-09-1996
		JP 8062209 A	08-03-1996
		KR 150390 B	01-10-1998
		US 5563067 A	08-10-1996
SU 1124022 A	15-11-1984	AUCUN	